



TITLE:

自由11 ニホンザル末梢リンパ球より Simian Immunodeficiency
Virus分離の試み(III 共同利用研究
2.研究成果)

AUTHOR(S):

村山, 裕一

CITATION:

村山, 裕一. 自由11 ニホンザル末梢リンパ球より Simian Immunodeficiency Virus分離の試み(III 共同利用研究 2.研究成果). 豊長類研究所年報 1991, 21: 81-82

ISSUE DATE:

1991-09-30

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164220>

RIGHT:

在するものと考えられていた。ニホンザルとアカゲザルが同じ遺伝子地図を有していると考ええると、従来考えられていた位置とは異なる位置にマッピングされ、進化の過程で何らかの染色体構造の変化が生じたものと考えられる。

自由9:

免疫グロブリンC。遺伝子のヒンジ領域からみた霊長類の進化

渡辺裕二(東京大・理)

免疫グロブリンC。遺伝子のヒンジ領域はヒト上科においては15塩基を基本単位とした繰り返し構造を有し、進化過程でその長さを変化させてきたことが明らかにされている。またC。遺伝子はヒト上科の進化の過程で遺伝子重複と欠失によりゲノム中でのコピー数を変化させてきている。これに対しカニクイザルはゲノム中に1つのC。遺伝子しかもたず、またそのヒンジ領域にはヒト上科にみられた15塩基の繰り返し構造がみられない。そこで旧世界ザル全体でC。遺伝子及びそのヒンジ領域の進化過程を明らかにするために、まずカニクイザル以外の旧世界ザルについてC。遺伝子のゲノム中のコピー数をサザン法により調べた。

調べた旧世界ザルは次の4属7種22個体である：ニホンザル(*Macaca fuscata*) 6個体、アカゲザル(*M. mulatta*) 6個体、タイワンザル(*M. cyclopis*) 3個体、ブタオザル(*M. nemestrina*) 1個体、マントヒヒ(*Papio hamadryas*) 3個体、パタスザル(*Erythrocebus patas*) 1個体、ミドリザル(*Cercopithecus aethiops*) 2個体。これらの高分子DNAを末梢血より抽出し、制限酵素Bgl IIで完全消化し、ヒトC。2遺伝子を含むDNA断片をプローブとしてサザン実験を行なった。その結果、すべての個体で1本のバンドが検出され、バンドの大きさはパタスザルとミドリザルで10.5kbである以外はすべてほぼカニクイザルと同じ16.5kbであった。したがって、カニクイザルを含めて旧世界ザルはゲノム中に1つのC。遺伝子を有し、その数に変異はないことが示された。現在、カニクイザルC。遺伝子のヒンジ領域の周辺領域をプライマーとして、上記旧世界ザルを含む種々の旧世界ザルについてPCR法でヒンジ領域の構造を明らかにしつつある。

自由10:

10血痕の人獣血鑑別に関する研究—高速液体クロマトグラフィーによる簡便・迅速な鑑別法の開発—

高部福太郎・井上博之(名市大・医)

血液及び血痕の種属鑑別は法医学の実践においてきわめて重要な課題の一つであり、主としてヒトヘモグロビン特異抗体を使用した多数の方法が開発され、実践されている。しかしながら免疫血清学的方法では検体が人血由来でなかった場合、その動物の種属を決定するためには、多種類の動物ヘモグロビンに対する抗血清を用意しなければならない。我々は昨年度の研究において高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりヒト、ヒト以外の霊長類17種及びその他の脊椎動物11種からのグロビン鎖を相互に分離する条件を考案し、血液及び血痕から種属鑑別を行う方法として応用した。使用したHPLC用カラムはSynchropak RP-4(4.6×250mm)であり、0.1%トリフルオロ酢酸存在下、水-アセトニトリルのグラジェント溶出で分析を行った。今年度は同タイプのセミマイクロボアカラム(2.1×250mm)を使用して高感度な検出法を検討した。

流速を0.2ml/minとし、アセトニトリルの溶出勾配を若干改良することで、昨年とほぼ同様なクロマトグラムが得られた。分析に要したHb量は約1μgであり、昨年と比較して約40倍の高感度を得ることが出来た。流速を1/5に下げることによってアセトニトリルの使用量も下がり、ランニングコストを軽減することが出来た。

通常マイクロボアカラムを使用するには、低流速において脈流の無い安定な送液や溶出勾配を得るための特殊なHPLCポンプシステム、試料拡散を極力抑えるためのより細い内径の配管や検出器内のフローセル等を使用しなければならない。しかしながら今回検討したセミマイクロボアカラムの場合、特別な配慮なしに昨年度使用したシステム(Ultrochrom GTi, LKB)に接続するだけで安定な結果を得ることが出来た。

本法は簡便性、迅速性、高感度及び種属特異性の点で優れ、法医学上有用であると考えられる。

自由11:

ニホンザル末梢リンパ球よりSimian Immunodeficiency Virus 分離の試み

村山裕一(予研・筑波霊長類センター)

アフリカミドリザルやスーティマンガベイなどから HIV (Human Immunodeficiency Virus) 類似の SIV が分離されており、エイズ感染モデルとして注目されている。ニホンザルでは STLV-1 の感染が知られているが、血清抗体の調査では SIV 感染の例はほとんど知られていない。本研究では免疫担当細胞の一つのサブセット、CD8 陽性細胞 (サブプレッサー/細胞障害性 T 細胞) を人為的に取り除くことによって、SIV 感染細胞に対する免疫監視を不活化し、ニホンザルにおける SIV 感染を検討した。

霊長類研究所のニホンザル 30 頭から採血を行った。血清を PBS で 10 倍希釈し、STLV-1 陽性 MT1 細胞スマアおよび SVI mac251 陽性 Hut78 細胞スマアを用いて間接蛍光抗体法で血清抗体価を測定した。その結果、16 頭 (53%) が STLV-1 抗体陽性であった。一方、全頭が SIV 抗体陰性であった。

ニホンザル CD8 抗体 (U2) と補体処理で CD8 細胞を取り除く方法、あるいは CD4 抗体を用いた FACS ソートまたは間接パンニング法で CD4 細胞を濃縮した。分離後、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の ConA と 100U/ml の IL2 を含む 15% FCS-RPMI1640 培地で培養を開始した。培養後、1 週間以内には STLV-1 由来と思われる小 CPE 形成が数頭のニホンザルで観察された。培養 20 日目以降、5 頭に SIV 感染細胞にみられるような巨大 CPE 細胞が出現し、やがて細胞は死滅した。CPE を形成した時点の細胞を用いてアセトン固定スマアを作製し、SIV mac251 接種アカゲザルの SIV 抗体陽性血清を用いて、間接蛍光法で SIV 抗原を検索した。その結果、これら 5 頭は SIV 抗原陽性である事が判明した。

今後ニホンザルにおける SIV 感染をウェスタンブロット法などで検討し、確証を得ると共に野生ニホンザルの SIV 感染も検討したい。

自由12:

精巣に特異的な塩基性タンパク値の比較生化学的検討

大原生子 (近畿大・医)

ラット成獣の精巣中にある塩基性タンパクのうち、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE と略す) で分子量が 4K に相当する

位置に泳動されるタンパク (4K タンパクと略す) が、ブタ、サル、サルの精巣にも存在し、これが精子形成に関与するタンパクである事を、前年度に報告した。今回は、1) 4K タンパクの発現する時機、2) サルにおける季節及び加齢による動態について報告する。精子形成の未熟な生後 15 日のブタの精巣 (ライディッヒ細胞、セルトリ細胞精祖細胞からなる) 及び精祖細胞から精母細胞への分化系に異常のある不妊ラットの精巣からは、SDS-PAGE で 4K を示すタンパクのバンドはえられなかった。発現量が微量のため、SDS-PAGE では検出出来ないのか、あるいは精子形成の初期には必要のないタンパクか、これまでのところ不明である。季節繁殖性を示すニホンザルで、繁殖期 (9 月) 及び非繁殖期 (5 月)、と加齢による 4K タンパクの動態を調べた。6 才令の繁殖期、非繁殖期の精巣中の 4K タンパクは、SDS-PAGE で、タンパク量あたりのバンドの濃淡が、後者に比して前者では強いバンドを示した。一方 2 才令の繁殖期の 4K タンパクのバンドは、拡散しておりバンドとしてみとめられなかった。更に正確な情報をえるために、分子レベルでの検討を加えた。既にラット精巣でえられている 4K タンパクのアミノ酸配列より予想される DNA 配列から、18mer のオリゴヌクレオチドを DNA 合成機にて合成し、これに³²S 及びビオチンラベルし、これをプローブとして in situ-Hybridization 法にて 4K タンパク-mRNA の局在を検討した。ラットでは精子形成開始前の 3.5 週前からポジティブな像がえられた。サルの加齢、季節による変化については、検討中である。更に発現機構を詳細に知るために 4K タンパク遺伝子のクローニングを計画し、抗体作製及び cDNA-ライブラリーの作製を試みている。

自由13:

法医鑑識領域における各種試料の人獣鑑別に關する研究—霊長類とヒトの血液の鑑別を中心として—

玉木敬二・佐藤啓造・勝又義直 (名大・医)
山本敏充・堤 肇 (愛知県警・科捜研)

法医鑑識領域における血痕や尿斑等の動物鑑別は重要な検査の一つであり、酵素免疫測定法の応用などにより多くの成果が得られているが、その